



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

공학석사 학위논문

생분해성 고분자 기반의
약물전달시스템 제작 및
in vitro 효능 검증

Fabrication and *in vitro* Evaluation of
a Biodegradable-Polymer-Based
Drug Delivery System

2015 년 2 월

서울대학교 대학원

전기컴퓨터공학부

송 병 화

생분해성 고분자 기반의
약물전달시스템 제작 및
in vitro 효능 검증

Fabrication and *in vitro* Evaluation of
a Biodegradable-Polymer-Based
Drug Delivery System

지도 교수 조 동 일

이 논문을 공학석사 학위논문으로 제출함
2015 년 2 월

서울대학교 대학원
전기컴퓨터공학부
송 병 화

송병화의 공학석사 학위논문을 인준함
2015 년 2 월

위 원 장 _____ 김 성 재 _____ (인)

부위원장 _____ 조 동 일 _____ (인)

위 원 _____ 서 종 모 _____ (인)

초 록

일반적인 항암 치료에서는 항암제 자체의 본질적인 독성으로 인해 제한된 용량의 약물만 체내에 투여하게 되며, 체내에서의 약물 흡수 및 종양 부위로의 약물 이동 과정에서의 소실로 인해 투여된 약물 대비 치료 효율이 낮고, 전신 부작용이 발생할 가능성이 높다. 또한, 액상 항암제의 사용은 약물이 체내에서 오랜 시간 약효를 발휘하지 못하고 분해 또는 배설되어, 주기적인 약물 치료가 필요하다. 이러한 문제들을 해결하기 위해 약물을 종양 부위로 전달하는 약물전달시스템이 전 세계적으로 활발하게 연구되고 있으며, 박테리아의 종양 표적 능력을 이용한 박테리아 기반의 약물전달시스템도 보고되고 있다. 그러나, 현재까지 제안된 대부분의 약물전달시스템은 액체 항암제를 사용하여 제작되므로 주기적인 약물 치료의 굴레를 벗어나지 못하고 있다.

본 논문에서는 종양 세포를 표적으로 이동하여 약물을 지속적으로 분비하는 박테리아 기반의 약물전달시스템을 구현하는데 필요한, 고체의 약물이 장전된 약물장전구조체의 제작 및 *in vitro* 환경에서의 검증을 다루고 있다. 제안된 약물전달시스템에서 생분해성, 생적합성 고분자 물질인 polycaprolactone (PCL)이 약물 전달의 매개체로, 분자표적 치료제인 Lapatinib을 항암제로 사용하였다. PCL과 Lapatinib은 미국 식품의약청으로부터 그 안정성을 검증 받아, 각각 생체 의학용 장치 및 전이성 유방암 또는 위암 치료 약물로 사용 할 수 있다.

약물장전구조체 제작을 위해 적층 공정을 이용하여 PCL 용액과 고체 상태의 Lapatinib을 박막 형태로 실리콘 웨이퍼 위에 순차적으로 도포하였고, X-ray 노광 공정을 통해 고체 상태의 Lapatinib이 장전된 약물장전구조체를 제작하였다. 이 후, 제작 과정에서의 Lapatinib 활성화도 변화 및 제작된 약물장전구조체의 약물 분비 특성을 평가하기 위해 인간 위암 세포인 NCI-N87 세포를 이용하여 *in vitro* 환경에서의 세포 생존을 확인 실험을 진행하였다.

실험 결과, 적층 공정에 의해 장전된 Lapatinib의 half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) 값이 0.05 μ M에서 0.1 μ M로 감소하였으나, 여전히 NCI-N87 세포에 민감하게 반응하는 성질을 보여주어 실제 항암 치료에 사용 가능함을 확인하였다. 또한, 제작된 약물장전구조체의 크기 및 장전 약물의 농도가 증가할수록 세포 성장을 억제하는 능력이 더 우수한 사실을 확인하였으며, 144 시간 동안 진행된 장시간 약물 분비 실험에서도 세포 성장이 효과적으로 억제되었다.

상기 실험들을 통해 본 논문에서 제작한 약물장전구조체의 종양 성장 억제 능력을 확인하였으며, 종양 세포를 표적으로 이동하여 약물을 분비하는 약물전달시스템에 응용 가능 할 것으로 기대한다.

주 요 어 : 약물전달시스템, 생분해성 고분자, polycaprolactone (PCL), X-ray 노광, Lapatinib

학 번 : 2013-20805

목 차

초 록	i
-----------	---

목 차	iii
-----------	-----

그림목차	v
------------	---

제 1 장 서 론	1
-----------------	---

제 1 절 연구의 배경	1
--------------------	---

제 2 절 연구의 내용	5
--------------------	---

제 2 장 제 작	7
-----------------	---

제 1 절 약물장전구조체	7
---------------------	---

제 2 절 생분해성 고분자	8
----------------------	---

제 3 절 분자표적 치료제	9
----------------------	---

제 4 절 적층 공정	11
-------------------	----

제 5 절 노광 공정 및 제작 결과	14
---------------------------	----

제 3 장 검 증	20
제 1 절 중양 세포 및 배양.....	20
제 2 절 MTT assay.....	21
제 3 절 약물 변성 검증.....	23
제 4 절 크기 및 농도에 따른 효능 검증	27
제 5 절 장시간 약물 분비 효능 검증.....	32
 제 4 장 결 론	 37
제 1 절 결론.....	37
제 2 절 향후 연구 계획.....	39
 참고문헌.....	 41
 Abstract	 50
 감사의 글	 53

그림 목차

[그림 1] 박테리아 기반의 약물전달시스템 개념도	3
[그림 2] 적층 공정 개념도.....	13
[그림 3] 전체 공정 진행 개념도	14
[그림 4] 포항 가속기연구소의 X-ray 노광 공정 개념도.....	15
[그림 5] 제작된 약물장전구조체를 25분 현상한 결과	17
[그림 6] 제작된 약물장전구조체의 SEM 측정 결과.....	18
[그림 7] 제작된 약물장전구조체의 형광 현미경 측정 결과	19
[그림 8] 열 에너지에 의한 Lapatinib 변성 확인 실험 결과.....	25
[그림 9] 약물장전구조체 크기별 실험 결과	28
[그림 10] 약물장전구조체 개수별 실험 결과	30
[그림 11] Lapatinib 농도 및 일차별 실험 결과.....	34
[그림 12] 약물장전구조체의 개수 및 일차별 실험 결과.....	35

제 1 장 서 론

제 1 절 연구의 배경

일반적인 항암 치료에 사용되는 약물들은, 암세포뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 주어 전신 독성이 발생할 가능성이 높기 때문에, 다량의 약물을 복용하거나 혈관 주사를 하기 어렵고, 엄격한 용량 조절이 필요하다. 또한, 경구 혹은 정맥 투여한 약물은 체내에서의 흡수 및 종양 부위로의 이동 과정에서 분해 또는 배설에 의해 대부분이 소실되며, 이로 인해 종양 부위까지 도달하는 약물은 더욱 적어진다. 이는 항암 치료에 사용되는 약물의 투여량 대비 치료 효율을 낮추는 원인으로, 앞서 언급한 문제점과 함께 현재 사용되는 일반적인 항암 치료의 단점으로 지적된다.

장기간에 걸친 항암 치료가 필요한 경우, 약효 지속 시간을 고려한 주기적인 약물 주사 또는 경구 투여가 필요하고, 이에 따라 환자의 불편과 부작용이 증가한다. 더불어, 유효 치료 농도의 약물이 종양 부위에 적절한 시간에 전달되지 않을 경우 항암 치료의 유효성 및 연속성이 사라지고 항암 치료의 효율 역시 감소하는 문제가 발생된다. 상기 제시된 문제점들을 해결하기 위해 약물을 종양 부위로 전달하는 약물전달시스템의 개념이 제시된 후, 전 세계적으로 약물전달시스템에

대한 연구가 활발히 진행 되고 있다 [1, 2].

선행 연구에서, 용매 유화 방식 (Emulsification) [3] 및 미세 유체 플랫폼 (Microfluidics platform) [4]을 이용하여 액상의 약물이 장전된 나노 또는 마이크로미터 크기의 구체 형태로 약물전달시스템을 제작한 사례가 보고되고 있다. 이 약물전달시스템들은 액상의 약물이 유화된 고분자 물질에 의해 둘러 쌓인 구형으로, 제작 공정은 비교적 간단하지만 약물을 장전한 구체에서 약물이 일시적으로 분사되므로 약물 효능의 지속성을 장시간 동안 유지하지 못한다.

마이크로미터 크기의 바늘 (Micro needle)을 통해 저장고에 장전된 약물을 체내로 전달하는 약물전달시스템에 대한 연구 결과도 보고되고 있다 [5]. 이 방식은, 체내에 마이크로미터 크기의 바늘을 가지는 저장고를 삽입하는 과정이 필요하며, 약물 분비 완료 후에도 삽입물이 체내 이물질로 남게 된다.

온도, 근적외선 [6] 또는 pH [7] 등과 같은 특정 조건에 민감한 물질 [8, 9]을 이용한 약물전달시스템에 대한 연구 결과도 보고되고 있다. 약물이 온도, 적외선 또는 pH 민감성 물질로 둘러 쌓여 있으며, 신체의 특정 부위 또는 종양 주변에서 온도 또는 pH 조건에 의해 이 물질이 분해되어 약물이 방출된다. 또한, 외부에서의 적외선 자극에 의해 약물이 분비되는 약물전달시스템도 제안되었다 [6]. 그러나, 이 약물전달시스템들은 기후 및 환경에 의한 영향을 고려하지 않았으며, 신체 활동에 의한 온도 및 pH 변화 등에 물질이 반응 할 가능성이 존재하여, 원하지 않은 약물 분비가 발생 할 수 있다. 또한, 신체 외부의

자극에 의해 반응하는 약물전달시스템의 경우, 종양 세포 주변의 정상 세포에도 외부 자극이 영향을 주는 부작용을 가진다.

박테리아가 종양 세포를 향해 다가가는 주화성 (Chemotaxis)을 나타내는 성질이 보고된 후 [10, 11], 박테리아의 주화성 및 이동성을 이용한 박테리아 기반의 약물전달시스템도 제안되었다 [12-14]. 박테리아 기반의 약물전달시스템을 이용한 항암 치료 개념도가 그림 1에 제시되어 있다. 박테리아 기반의 약물전달시스템은 약물을 담은 물질의 표면에 박테리아를 물리적 또는 화학적으로 결합하여, 박테리아의 이동을 통해 약물을 담은 물질을 종양 세포 근처로 전달하는 개념에서 시작되었다.

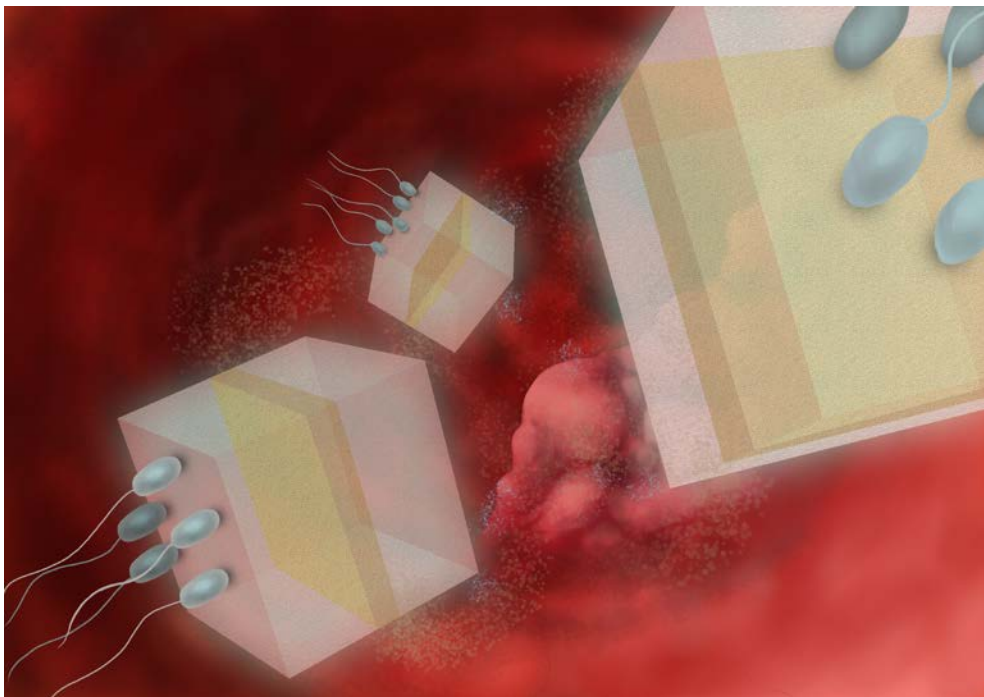


그림 1. 박테리아 기반의 약물전달시스템 개념도

박테리아 기반의 약물전달시스템에서는, 박테리아가 세포를 죽이는 세포 독성 (Cytotoxicity) 문제를 미연에 방지하고자, 유전적으로 독성이 약화된 박테리아를 사용하게 된다. 또한, 약물을 담는 물질은 체내에서 약물을 분비 할 수 있도록 하기 위해 생체 내에서 사용 가능한 생분해성 고분자 또는 pH 민감성 물질 등과 같이 주변 환경의 변화에 민감하게 반응하는 물질들로 구성된다 [7-9, 15].

하지만, 현재까지 개발된 약물전달시스템은 일반적인 화학 치료제를 사용함으로써 치료제 자체의 본질적인 세포 독성에 대한 문제를 해결하지 못하거나, 액상의 치료제를 사용함으로써 체내에서 비교적 짧은 시간 동안만 효능을 발휘하게 된다. 이로 인해, 세포 독성의 위험성을 근본적으로 극복하지 못하고, 낮은 효율 및 주기적인 약물 치료의 굴레를 벗어나지 못하고 있다.

이와 같은 문제들을 해결하기 위해, 세포 독성이 없는 분자표적 치료제를 고체 상태로 이용하여 종양 세포의 증식을 억제하는 방안이 대두되고 있다. 또한, 생분해성, 생적합성 고분자 물질을 약물 전달의 매개체로 사용하여 체내에서 약물을 장시간 동안 지속적으로 분비하는 약물전달시스템의 필요성과 중요성이 강조되고 있다.

제 2 절 연구의 내용

본 논문에서는 일반적인 항암 치료에서 발생하는 화학 치료제의 세포 독성 문제, 낮은 효율 및 일시적인 치료 효과 문제를 해결하기 위해, 분자표적 항암제를 종양 세포 주변으로 전달하고 지속적으로 약물을 분비하는 박테리아 기반의 약물전달시스템의 개념을 소개하고 있다. 또한, 약물전달시스템을 구현하기 위해 필요한, 고체의 약물이 장전된 약물장전구조체의 제작 및 *in vitro* 환경에서의 검증을 다루고 있다.

본 논문에서 제작한 약물장전구조체는 생분해성 고분자 물질인 PCL (Sigma Aldrich Korea Ltd., Korea)을 약물을 전달하는 매개체로 사용하였다. PCL은 미국 식품의약청으로부터 그 안정성을 검증 받아 생체 의학용 장치로의 사용을 허가 받았다. 또한, 분자표적 치료제인 Lapatinib (GlaxoSmithKline, U. S. A.)을 전달될 항암제로 사용하였다. Lapatinib은 특정 분자와 결합하여 작용하는 분자표적 치료제의 일종으로, epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) 및 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2/ErbB2)와 활발하게 결합하여 종양 세포의 증식을 억제한다 [16–19]. Lapatinib은 미국 식품의약청으로부터 그 안정성 및 효능을 검증 받아 악성 또는 전이성 유방암 및 위암 치료에 사용되고 있다 [20].

박테리아 기반의 약물전달시스템에 응용하기 위해서는, 박테리아의 편모 운동에 의한 추진력이 약물장전구조체에 한 방향으로 작용하여

약물전달시스템의 이동성을 극대화 할 필요가 있다. 이는, Lapatinib이 탑재된 PCL의 특정 표면에 박테리아를 선택적으로 부착하여 실현 가능하므로, PCL이 구형이 아닌 특정한 모양을 가지는 것이 유리하다. 이를 위해, 실리콘 웨이퍼 및 poly (dimethylsiloxane) (PDMS) (Sigma Aldrich Korea Ltd., Korea) 박막 위에 PCL 박막을 형성하고, 적층 공정을 통해 Lapatinib을 PCL 박막 사이에 장전하였다. 이 후, X-ray 방사광 노광을 이용하여 가로, 세로 높이가 10 μm 에서 50 μm 까지 다양하며, 높이가 25 μm 인 직육면체 또는 정육면체 형태의 약물장전구조체로 제작하였다.

적층 공정 과정에서 Lapatinib을 65 $^{\circ}\text{C}$ 온도로 5 분간 가열하여 Lapatinib의 활성도에 영향을 주었으므로, 이 영향을 확인하기 위해 NCI-N87 (American Type Culture Collection, U. S. A.) 세포를 이용한 *in vitro* 환경에서의 세포 생존율 확인 실험을 진행하였다. 측정된 IC_{50} 값을 토대로, 온도 영향을 받은 Lapatinib과 온도 영향을 전혀 받지 않은 Lapatinib의 활성도 차이를 비교하였으며, 적층 공정이 Lapatinib 활성도에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인하였다.

마지막으로, 제작된 약물장전구조체의 크기 및 개수 증가에 따른 세포 생존율 확인 실험을 통해 약물장전구조체의 크기와 개수에 따른 약물 분비 효능 및 종양 성장 억제 능력을 확인하였으며, 144 시간에 걸친 장시간의 세포 생존율 확인 실험을 통해 장시간 치료 용도의 약물전달시스템으로의 응용 가능성을 확인하였다.

제 2 장 제 작

제 1 절 약물장전구조체

약물전달시스템은 약물을 담고 있는 저장고 또는 약물 자체와, 그것들을 종양 부위로 전달할 동력원으로 구성된다. 이 중, 앞서 소개한 박테리아 기반의 약물전달시스템은 박테리아가 종양 세포를 쫓아 이동하는 박테리아의 주화성이라는 [10] 성질을 시스템의 동력원으로 이용한다 [14]. 이 성질을 이용하기 위해, 약물 또는 약물이 장전된 저장고의 표면에 박테리아를 물리적 또는 화학적으로 결합시키고, 박테리아의 이동을 통해 약물 또는 저장고를 종양 부위로 전달한다.

본 논문에서는 박테리아 기반의 약물전달시스템 구현에 필요한 저장고 역할의 약물장전구조체를 제작하였다. 생분해성 고분자 물질인 PCL 박막 사이에 고체 상태의 분자표적 치료제 Lapatinib이 장전된 직육면체 또는 정육면체 모양의 약물장전구조체를 제작하고, *in vitro* 환경에서 제작된 약물장전구조체의 종양 세포 증식 억제 성능을 평가하였다. 기존에 보고된 미세 유체 플랫폼에서의 물리적인 박테리아 흡착 방법 [21]등을 이용하여 동력원을 붙이면 약물전달시스템으로 응용이 가능할 것으로 기대된다.

제 2 절 생분해성 고분자

생분해성, 생적합성 고분자 물질은 생체 내에서 효소 및 세포와의 작용으로 인해 화학적으로 서서히 분해되는 성질을 가진다 [22, 23]. 주로 약물전달시스템과 같은 생체 의학용 장치에 생분해성, 생적합성 고분자 물질인 polyethylene glycol (PEG), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), poly (lactic acid) (PLA) 및 PCL이 사용되며, 이러한 고분자 물질의 화학적 결합을 이용한 혼합물도 다양하게 연구되고 있다 [24]. 또한, 다양한 생분해성 고분자 물질을 이용한 생체 의학용 장치 및 약물전달시스템 개발 연구가 보고 되고 있다.

이 중, PCL은 다른 물질에 비해 생분해 속도가 비교적 느리고, 녹는점이 65 ℃로 비교적 낮은 편이며, 가격이 저렴하다. 또한, 선행 연구에서 PCL의 다양한 제조 공정 방법이 소개되었다 [15]. 본 논문에서는 장시간 분비용 약물전달시스템 제작을 위해, 생분해성, 생적합성 합성 고분자 물질 중 생분해 속도가 상대적으로 느린 편에 속하는 PCL을 약물 전달의 매개체로 사용하였다.

제 3 절 분자표적 치료제

일반적인 항암 치료 방법으로는 크게 외과적인 수술, 항암 화학 요법 및 방사선 치료 요법이 있다. 특히 외과적인 수술은 종양 세포를 제거하는 치료 방법으로 암 치료에 있어 가장 확실하고 널리 사용되는 항암 치료 방법이다. 그러나 후복막에 다른 장기들에 둘러 쌓여 있는 췌장과 같이 외과적으로 수술이 매우 어려운 장기에는 적용하기 어렵다. 또한, 종양 세포가 이미 신체 다른 부분으로 전이된 경우 수술로는 완치할 수 없으며, 재발의 가능성이 존재하기 때문에 완치를 위해서는 항암 화학 요법 또는 방사선 치료 요법이 병행되어야 한다.

방사선을 이용한 치료는 파장이 매우 짧고 높은 에너지를 가지는 방사선을 이용하여 환자를 치료하는 임상의학의 한 방법이다. 주로 악성 종양을 치료하지만 일부 양성 질환 치료에도 사용된다. 이 방식은, 치료 방법에 따라 표적이 되는 암세포만 죽는 것이 아니라 정상 세포와 조직에도 영향을 미칠 수 있으며, 이로 인해 피부 조직 손상, 탈모, 구토 및 복부통증 등 다양한 부작용이 나타날 수 있다.

화학 치료제를 사용하는 항암 화학 요법의 경우, 빠르게 증식하는 세포를 죽이는 항암제를 사용하여 종양 세포를 사멸시킨다. 그러나 이러한 일반적인 항암제의 경우 종양 세포 이외에도 빠르게 증식하는 기관인 골수, 머리카락, 점막 등의 정상 세포까지 손상을 받을 수 있기 때문에 골수억제, 탈모, 점막염 등의 부작용이 발생 할 수 있다 [25, 26]. 이로 인해 제한된 용량의 약물만 투여하지만, 체내에서의 흡수,

분해 및 소실로 인해 치료 효과가 더 낮고 주기적인 치료가 필요하다.

이러한 세포 독성 문제 및 부작용을 극복하고 효과적으로 종양 세포를 공격하기 위해, 분자표적 치료제를 이용한 치료 방법이 연구되고 있다 [27, 28]. 분자표적 치료제는 정상 세포를 공격하지 않고 종양 세포에 존재하는 특정한 분자와 결합하여 암세포의 증식을 억제하는 역할을 한다. 이는 종양 세포가 정상 세포의 유전자 이상 과정을 통해 발생하게 된다는 사실에 착안하여, 세포가 변하는 이상 과정 및 종양 세포의 증식 과정에서 발현되는 표적 인자와 반응하여 종양 세포의 증식을 억제하는 것이다. 이 경우 정상 세포들은 거의 공격받지 않기 때문에 기존 화학 치료제에 비해 부작용이 훨씬 적다.

본 논문에서는 분자표적 치료제 중 Lapatinib을 사용하였다. Lapatinib은 분자표적 치료제의 일종으로, EGFR/ErbB1 및 HER2/ErbB2와 결합하여 종양의 증식을 억제한다 [16-19]. Lapatinib은 특히 NCI-N87 세포와 같이 HER2/ErbB2에 양성인 종양 세포에 매우 민감하게 반응하며, 노란색의 분말 형태로 판매되어 본 논문에서 사용한 적층 공정 및 X-ray 노광 공정에 적용이 가능하고, 형광 현미경 등을 이용한 측정에도 용이하다.

제 4 절 적층 공정

약물전달시스템에 사용되는 약물 장전 방법은 일반적으로 용매 유화 방식 또는 미세 유체 플랫폼 [4]과 같이 액상의 약물을 용매화된 물질로 감싸는 방식을 사용한다. 용매 유화 방식은 상호 작용하지 않는 또는 섞이지 않는 두 개의 액체를 강력히 교반하여 한 개의 액체가 아주 작은 방울 형태로 안정하게 다른 액체 속에 분산되어 유제를 형성하게 하는 기법이다. 실제 서로 녹지 않는 두 가지 액체는 물과 기름을 의미하며, 수중에 기름이 분산된 수중유적형 (Oil-in-water, 이하 O/W) 및 그 반대인 유중수적형 (Water-in-oil, 이하 W/O)이 존재한다. 각각의 방식은 약물 전달 매개체의 수용성 또는 지용성 성질에 따라 사용될 수 있다. 미세 유체 플랫폼 역시 액상의 약물을 용매화된 물질로 감싸는 방식을 사용하며 용매 유화 방식과 흡사하다. 이 방법은 제작 과정이 비교적 간단하며 나노미터 크기를 가지는 구체 형태도 쉽게 제작이 가능하지만, 약물 분비가 순간적으로 일어나므로 약효가 장시간 지속되지 않는다.

약물을 장전하는 다른 방법으로는, 탄소 나노튜브 (Carbon nanotube, 이하 CNT) [29-31], 공중합체 또는 고분자 혼합물 [32]과 같은 물질에 화학적으로 약물을 결합시키는 것이다. 이 방법은 약물과 약물 전달 매개체 사이에 화학적으로 작용기를 연결하여 약물이 약물 전달 매개체에 결합되도록 한다. 그러나 이 경우, 제작 공정이 비교적 복잡하고 상대적으로 어려운 단점이 있다.

상기 방법들의 경우 지속적인 약물 분비 조절이 어려우며, 약물장전구조체의 특정 표면에 이동성을 위한 외력을 집중시키기 어렵다. 이를 해결하기 위해, 본 논문에서는 생분해성 고분자 물질인 PCL 박막으로 고체 상태의 표적 분자 치료제인 Lapatinib을 감싸는 형태로 만들었다. 이 과정에서 기존에 보고된 고분자 물질의 적층 공정을 이용하였다 [33]. 적층 공정의 원리는 서로 다른 물질 사이의 표면 에너지 및 결합력 차이를 이용한 것으로 공정 순서는 다음과 같다^①.

그림 2에는 적층 공정에 대한 개념도가 제시되어 있다. 먼저, PCL 알갱이를 dichloromethane (DCM) (Sigma Aldrich Korea Ltd., Korea) 용매에 10 % (w/v)의 비율로 녹여, 용액 상태의 PCL을 제작한다. 제작된 PCL 용액을 그림 2 (a)와 같이 각각 실리콘 웨이퍼와 PDMS 박막 위에 붓고 1,400의 분당회전수로 35 초 동안 스핀 코팅하여 10 μm 두께의 PCL 박막을 형성한다. DCM은 스핀코팅 과정에서 모두 증발하여 PCL 성분만 남아 10 μm 두께를 가지는 박막을 형성한다. 이 후, 실리콘 웨이퍼 위에 형성된 PCL 박막 위에 Lapatinib 가루를 얇게 도포하고 그림 2 (b)와 같이 PDMS 박막 위에 형성된 PCL 박막으로 덮어 두 PCL 박막이 접합된 상태로 만든다. 이 상태로 그림 2 (c)와 같이 가열기에서 65 $^{\circ}\text{C}$ 로 5 분 간 가열하면서 롤러로 실리콘 웨이퍼 전체를 눌러준다. 이 과정을 통해 PCL 박막 사이의 결합력이 증가하고, 두 개의 PCL 박막이 접합된다. 이 후, 그림 2

^① 서울대학교 전기컴퓨터공학부 조동일 교수의 지도하에, 박사과정 유형정이 적층 공정을 개발을 주도하였다 [33].

(d)에서처럼 표면 에너지와 서로 다른 물질 사이의 결합력 차이를 이용해 PDMS 박막을 물리적으로 자연스럽게 분리하면, PCL 박막 사이에 Lapatinib이 얇게 도포된 상태로 실리콘 웨이퍼 상에 존재하게 된다.

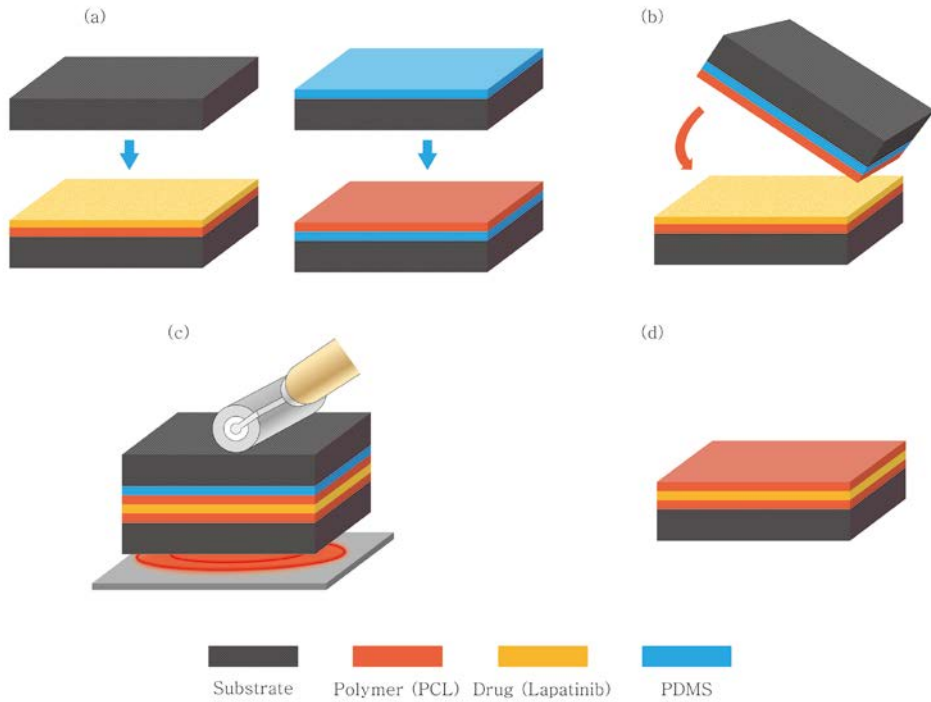


그림 2. 적층 공정 개념도

제 5 절 노광 공정 및 제작 결과

생분해성 고분자를 미세 가공하는 기술로는 전사 성형 (Replication molding), 캐속 조형 장치 (Rapid prototyping), 레이저 미세가공 (Laser micromachining) 및 광중합 (Photopolymerization) 등 다양한 방법이 보고되고 있다 [15, 34, 35]. 그러나 이 방법들의 경우 공정 시간이 길거나, 많은 수량의 약물장전구조체를 만들 수 없거나, 제작된 약물장전구조체를 낱개로 분리 및 수집하는 방법이 없다.

그리하여 본 논문에서는 특정한 모양을 가지는 약물장전구조체를 제작하는 방법으로 X-ray 방사광을 이용한 노광 공정을 사용하였다. 전체 제작 공정도는 그림 3에 제시되어 있다^②.

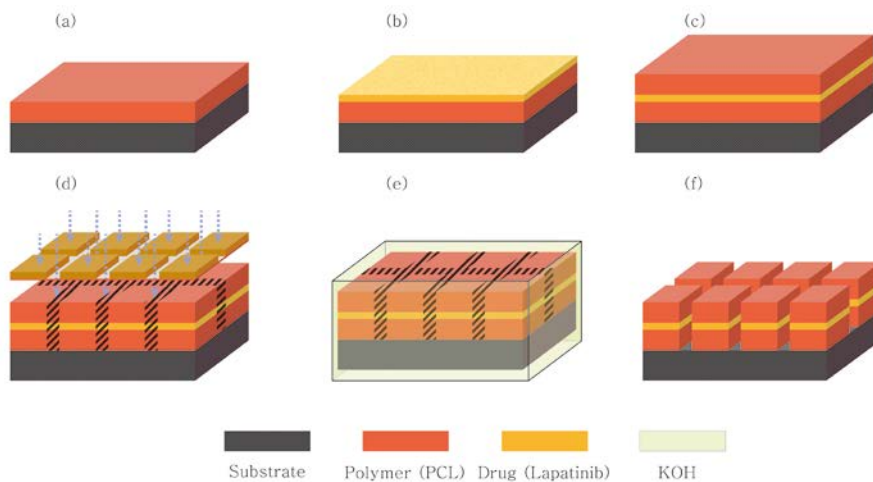


그림 3. 전체 공정 진행 개념도

^② 서울대학교 전기컴퓨터공학부 조동일 교수 지도하에, 박사과정 유형정이 X-ray 노광 공정을 설계를 주도하였다 [15].

그림 3 (a)–(c)는 앞서 언급한 적층 공정을 통해 만들어진다. 이후, 그림 3 (d)에 제시된 것과 같이 X-ray 노광 공정을 진행하고, 그림 3 (e)와 같이 KOH 용액으로 현상하면 약물장전구조체가 제작된다.

X-ray 노광 공정은 포항 가속기연구소 (Pohang, Korea)의 9D X-ray Nano-Micro Machining (9D XNMM) 빔라인에서 진행되었다. 그림 4에는 포항 가속기연구소에서 진행하는 X-ray 노광 공정의 개념도가 제시되어 있다.

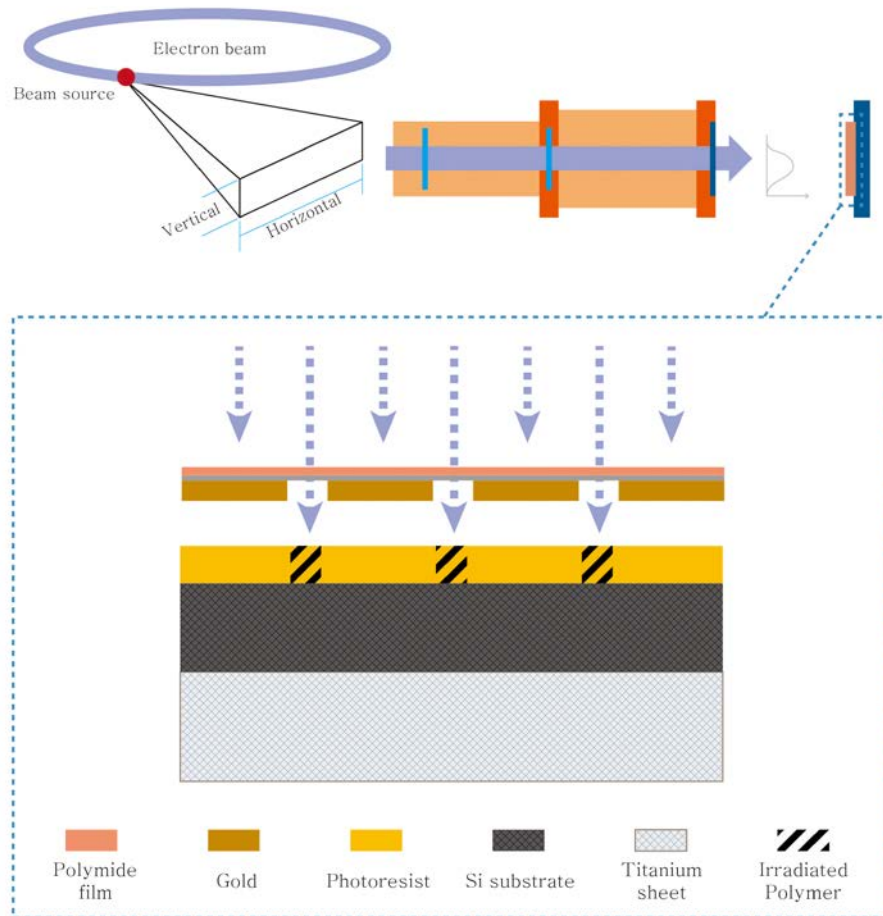


그림 4. 포항 가속기연구소의 X-ray 노광 공정 개념도

포항 가속기연구소에서는 선형 가속기 (Linear accelerator)에서 빛의 속도에 가깝게 가속된 전자들이 휨자석선 (Bending magnet)들로 이루어진 저장링 (Storage ring)으로 입사되고, 휨자석선에 의해 가속되면서 높은 에너지를 가지는 X-ray 방사광이 발생한다. 발생한 X-ray 방사광은 여러 광학 장치들을 통해 실험이 진행되는 빔라인으로 전달된다. 이 때, 빔라인으로 전달되는 X-ray는 좌우로 약 10 cm, 상하 약 1 cm의 폭을 가지며 상하로 Gaussian 분포의 에너지 분포를 가진다. 이와 같은 성질 때문에 X-ray 노광 시 상하 이동 제어가 가능한 서보 모터 시스템을 사용하여 웨이퍼 전면을 고르게 노광하게 된다.

앞서 적층 공정에서 제작한 Lapatinib이 장전된 PCL 박막이 올려진 실리콘 웨이퍼와, 가로, 세로 길이가 10 μm 에서 50 μm 로 다양한 정사각형 패턴이 새겨진 45 μm 두께의 X-ray 노광용 마스크를 척에 고정하였다^③. 이 것을 서보 모터 시스템을 이용하여 일정한 속도로 상하로 이동시키면서 실리콘 웨이퍼 전체를 총 45 분 간 200 mA의 빔전류로 노광하였다. 포항 가속기연구소에서 제공되는 프로그램으로 계산한 결과 실리콘 웨이퍼 전면에 걸쳐 약 15 kJ/cm^3 의 에너지가 조사되었다. 이 때, 마스크에 의해 가려진 부분은 0.002 kJ/cm^3 의 에너지를 받았다.

노광 공정 이 후, 45 % (w/v) 수산화칼륨 (Potassium hydroxide, 이하 KOH)을 이용하여 현상 공정을 진행하였다. X-ray 공정에서 마스크에 가려지지 않은 부분은 X-ray 방사광을 받아 PCL 단량체의

^③ 전자부품연구원의 수석연구원 정석원이 X-ray 노광용 마스크를 제작하였다.

결합들이 끊어진다 [36, 37]. 그에 반해, 마스크에 가려져 X-ray 방사광을 거의 받지 않은 부분은 PCL 단량체의 결합들이 그대로 유지된다. 이 차이는 KOH 용액 속에서 가수분해 되는 속도에 영향을 준다. X-ray 방사광을 받은 PCL 박막 부분은 KOH에 의해 상대적으로 빠르게 가수분해 되어 사라지며, X-ray 방사광을 받지 않은 PCL 박막 부분은 KOH 용액 속에서도 가수분해가 매우 느리게 일어나기 때문에 형태가 유지된다 [38]. 현상 공정 이 후, 초순수 (Deionized water, 이하 DIW)로 씻어내면, X-ray 방사광을 받지 않고 KOH 용액 속에서 남은 부분이 약물장전구조체가 된다.

아래 그림 5는 현상 공정이 약 25 분 진행 된 후 DIW로 씻어낸 약물장전구조체의 모습을 전자현미경 (Scanning electron microscope, 이하 SEM)으로 촬영한 결과이다.

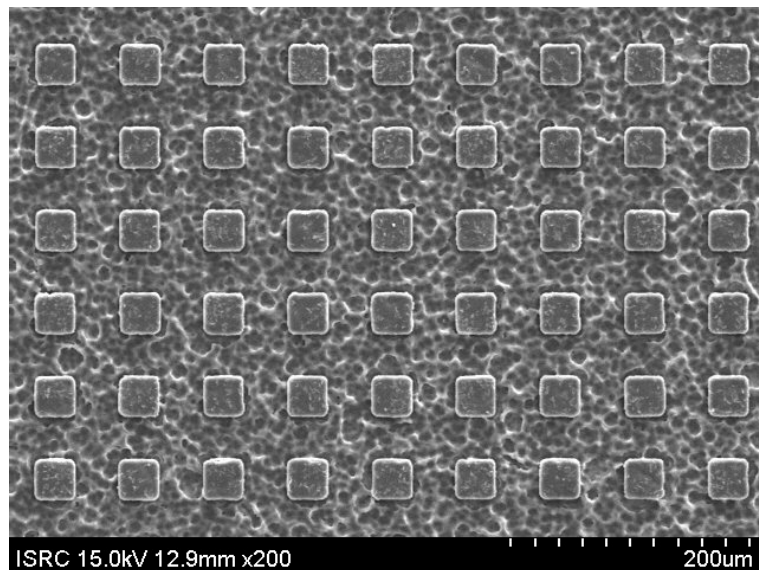


그림 5. 제작된 약물장전구조체를 25분 현상한 결과 [39]

X-ray 방사광을 받은 PCL 박막 부분은 KOH 용액에서 15분 동안 노출되면서 많은 부분이 가수분해되어 녹아서 사라졌지만, X-ray 방사광을 받지 않은 PCL 박막 부분은 25분 동안 노출되어도 큰 변화 없이 형태가 그대로 유지되었다.

아래 그림 6은 현상 공정을 50분 진행하고 얻은 약물장전구조체의 SEM 측정 결과이다. 약물장전구조체의 가로, 세로 길이는 $40\ \mu\text{m}$ 이며 높이는 $25\ \mu\text{m}$ 로 측정되었다. PCL 박막이 $10\ \mu\text{m}$ 의 두께를 가지는 것을 감안하면 약물이 약 $5\ \mu\text{m}$ 높이로 도포가 된 것을 알 수 있다.

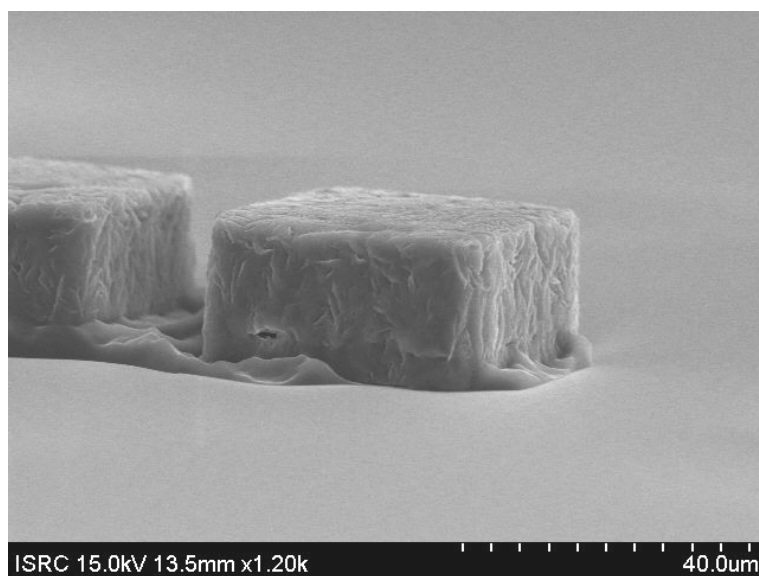


그림 6. 제작된 약물장전구조체의 SEM 측정 결과 [39]

다음으로, 그림 7에 제시된 것과 같이 형광 현미경 (Fluorescence microscope)을 이용하여 제작된 약물장전구조체의 측면을 촬영하였다. 불투명한 흰색 빛을 띄는 PCL과는 달리 노란색 빛을 띄는 Lapatinib의 성질을 이용하기 위해 형광 현미경을 사용하였다. 푸른색의 빛을

조사하여 촬영하였을 때, 약물장전구조체에 장전된 Lapatinib 층이 초록색 빛으로 나타났다. 그림 7에서의 20 μm 이므로, 앞서 SEM을 이용하여 측정한 약물장전구조체의 길이, 높이와 일치함을 알 수 있다. SEM 및 형광 현미경 촬영을 통해 제작된 약물장전구조체 내에 Lapatinib이 성공적으로 장전되어 있음을 추측 할 수 있다.



그림 7. 제작된 약물장전구조체의 형광 현미경 측정 결과

제 3 장 검 증

제 1 절 중앙 세포 및 배양

제작된 Lapatinib이 장전된 약물장전구조체의 항암 효과를 확인하기 위해, 실제 인간 위암 세포주인 NCI-N87을 이용하여 *in vitro* 환경에서의 세포 생존을 확인 실험을 진행하였다. NCI-N87은 인간 위암 세포주로 HER2/ErbB2 유전자 증폭이 발현된 세포이다.

실험에 사용하기 위해, NCI-N87 세포주를 Rosewell Park Memorial Institute-1640 (RPMI-1640) (WelGENE, Korea) 완전 배지 용액과 10 % 소태아 혈청 (Fetal bovine serum) (WelGENE, Korea), 1 % Gentamicin (Collgro, U. S. A.) 혼합 용액 속에서 37 ℃, 5 % CO₂가 존재하는 습한 환경을 통해 배양하였다^④.

^④ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 중앙내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 박테리아를 배양하였다.

제 2 절 MTT assay

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay [40]는 tetrazolium 계열 발색 시약으로 일반적으로 96 well plate 등과 같은 도구에 키운 세포끼리 성장 비율, 세포의 생존율 및 약물의 세포 독성을 비교 할 때 사용한다.

본 논문에서 진행한 MTT assay 실험은, 세포를 96 well plate에 24 시간 동안 배양하고 약물을 처리한 후, 모든 조작 과정 및 기간을 마치고 MTT 용액을 처리하는 순서로 진행되었다. 처음에 용액에 녹아 노란색을 띄는 MTT 용액은 세포 내에 있는 산화환원효소에 의해 환원되어 보라색으로 변한다. 이 후, 배지를 씻어낸 뒤 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma Aldrich Korea Ltd., Korea) 시약으로 세포를 녹여, 세포 내에 갇혀있던 보라색으로 변한 염료를 녹아 나오게 하고 이 것의 흡광도를 측정하는 순서로 진행되었다^⑤.

이와 같이, 96 well plate의 여러 well에 세포를 배양하고 각각 다른 처리를 한 후 MTT 용액을 넣고, 동시에 흡광도 측정을 진행하여 측정된 결과값들을 NCI-N87 세포에 아무 처리도 하지 않은 대조군의 측정 값과 비교하였다. 이 때, well에 존재하는 세포 수가 많을수록 보라색이 더 진하게 나타나 흡광도 값이 높게 측정된다. 즉, 약효가 약하거나 세포가 거의 영향을 받지 않았을 때, 흡광도 비례 값이 1에

^⑤ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 중앙내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 MTT assay 실험을 진행하였다.

가까워지며, 세포가 사멸하였을 때 0에 가까운 값이 나오게 된다.

이 때, 약물의 유효 농도로 판단되는 지점으로, 대조군 대비 세포 성장률이 50 %로 측정되는 약물의 농도인 IC_{50} 값을 SigmaPlot 프로그램을 이용하여 측정하였다. 또한 실험의 신뢰도를 향상시키기 위해 같은 실험군을 6 번 반복 실험을 진행하여, 측정된 평균값을 신뢰 구간 95 % 내에서 나타내었다.

제 3 절 약물 변성 검증

제 2 장에서 제작된 약물장전구조체는 적층 공정에서 65 °C의 열 에너지를 5 분간 받았고, 후속 공정인 X-ray 노광 공정에서 0.002 kJ/cm³의 X-ray 노광 에너지를 받았다. 이로 인해 Lapatinib의 활성도 변화가 우려되어, 제작된 약물장전구조체가 HER2/ErbB2와 반응하여 세포 증식을 억제하는지에 대한 확인 실험을 우선적으로 진행하였다.

첫 번째로, X-ray 노광 공정에서 받은 0.002 kJ/cm³의 X-ray 노광 에너지에 의한 Lapatinib의 활성도 변화에 대해 조사하였다. 선행 연구 조사 결과, 항암제 및 면역억제제로 사용되는 cyclophosphamide (CPH)와 악성 림프종 및 소화기 암 치료에 사용되는 doxorubicin hydrochloride (DOXO)에 각각 5 kGy의 γ 선을 조사하여도 어떠한 변성이나 퇴색이 발생되지 않았음을 확인하였다 [41]. γ 선 에너지 5 kGy를 Lapatinib에 대한 X-ray 노광 에너지로 환산한 결과 약 0.007 kJ/cm³로 계산되었다. 이는 약물장전구조체 제작 과정에서 Lapatinib에 조사된 X-ray 노광 에너지인 0.002 kJ/cm³ 보다 3 배 이상 높은 수치이다. 또한, Lapatinib의 결합 구조는 CPH와 DOXO보다 더 강한 결합을 가지고 있기 때문에 Lapatinib의 활성도가 X-ray 노광 과정에서 영향을 받지 않을 것으로 결론 내릴 수 있다.

두 번째로, 적층 공정에서 65 °C의 열 에너지를 5 분간 받은 것에 대한 평가를 진행 하였다. 아래와 같이 기존에 Lapatinib의 활성도를 측정하였던 4 가지 농도 범주와 동일한 농도 범주에서, 65 °C의 열

에너지를 5 분간 받은 Lapatinib 실험군을 이용하여 활성도를 비교하였다. 각각의 실험군에 대해서 6 번의 반복 실험을 진행하여 평균값이 신뢰 구간 95 % 안에 존재하도록 하였다.

※ 실험 조건

- 1) 대조군
- 2) 실험군 (Lapatinib 0.01 uM 투여)
- 3) 실험군 (Lapatinib 0.1 uM 투여)
- 4) 실험군 (Lapatinib 1 uM 투여)
- 5) 실험군 (Lapatinib 10 uM 투여)
- 6) 실험군 (Lapatinib 0.01 uM 투여, 65 °C로 5 분간 가열)
- 7) 실험군 (Lapatinib 0.1 uM 투여, 65 °C로 5 분간 가열)
- 8) 실험군 (Lapatinib 1 uM 투여, 65 °C로 5 분간 가열)
- 9) 실험군 (Lapatinib 10 uM 투여, 65 °C로 5 분간 가열)

위와 같은 실험 조건을 이용하여 MTT assay를 진행하였다. 총 6 개의 96 well plate에 단일 well 당 각각 3×10^3 개의 NCI-N87 세포를 나누고, 24 시간 동안 배양한 후 위 조건에 맞춰 실험을 진행하였다. 실험 기간은 총 72 시간이었으며, 실험 종료 후 MTT 용액을 처리하고 배지를 씻어낸 뒤 DMSO 처리를 통해 세포를 녹이고 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도에서 실험군을 대조군과 비교하여 SigmaPlot 프로그램을 통해 세포 생존율을 그래프화 하였다.

아래 그림 8은 일반적인 Lapatinib과 65 °C로 5 분간 가열한 Lapatinib을 이용한 실험 결과이다. 또한 분자표적 치료 효과 비교를 위해 Lapatinib에 저항성을 가지는 SNU-5 세포에 Lapatinib을 처리한 실험 결과까지 포함하였다. 그림에서 확인 할 수 있듯이, Lapatinib을 가열한 경우 가열하지 않은 Lapatinib을 사용한 것에 비해 전체 농도 구간에서 세포 생존율이 증가하였다. 이는 열 에너지에 의해 Lapatinib의 활성도가 낮아진 것을 의미한다. IC₅₀ 값을 비교해 본 결과, 기존의 Lapatinib은 0.05 uM인 것에 반해, 열 에너지를 받은 Lapatinib은 0.1 uM로 소폭 증가하였다. 그러나, SNU-5에 Lapatinib을 처리한 결과와 비교해 보면, 가열된 Lapatinib이 여전히 NCI-N87 세포에 민감하게 반응하며 세포 성장 억제 효능이 있음을 알 수 있다.

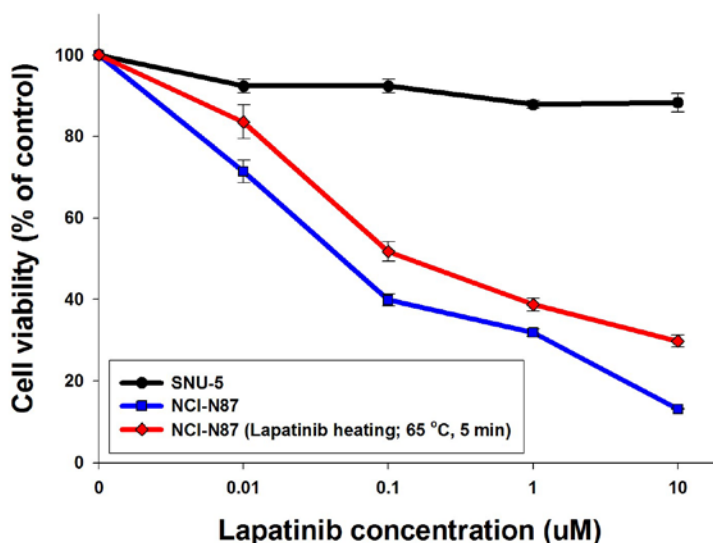


그림 8. 열 에너지에 의한 Lapatinib 변성 확인 실험 결과^⑥ [42]

^⑥ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 종양내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 실험 결과를 그래프화 하였다.

결론적으로, 본 논문에서 제작한 약물장전구조체에 포함된 Lapatinib 역시 일련의 제작 공정 과정에서 열 에너지를 받아 위 실험 결과와 같이 약효가 감소한 것으로 판단되지만, 여전히 HER2/ErbB2와 민감하게 반응하여 NCI-N87 세포의 성장을 효과적으로 억제하는 것을 알 수 있다.

제 4 절 크기 및 농도에 따른 효능 검증

제 3절에서, 제작된 약물장전구조체에 포함된 Lapatinib이 제작 공정 과정의 영향에도 불구하고 효과적으로 HER2/ErbB2 분자와 결합하여 세포 성장을 억제하는 사실을 확인하였다. 이 사실을 토대로, 제작된 약물장전구조체의 *in vitro* 환경에서의 세포 성장 억제 능력을 정량적으로 평가하기 위한 실험을 진행하였다.

첫 번째 실험에서는, 다양한 크기로 제작된 약물장전구조체를 이용하여, 약물장전구조체의 크기에 따른 약물 분비 효능을 평가하였다. 총 1 개의 96 well plate에 단위 well 당 각각 3×10^3 개의 NCI-N87 세포를 나누고 24 시간 동안 배양하였다. 이 후, 아래와 같이 투여한 약물장전구조체의 높이가 25 μm 로 고정되어 있고, 가로, 세로 길이가 각각 25, 30, 40, 50, 60 μm 로 증가 할 때, 72 시간 동안의 MTT assay 실험을 통해서 세포 성장 억제 효능을 확인하였다. 실험에 사용된 약물장전구조체의 개수는 100개로 통일하였다. 각각의 실험군에 대해서 6 회의 반복 실험을 진행하여 평균값이 신뢰 구간 95 % 안에 존재하도록 하였다.

※ 실험 조건

- 1) 대조군
- 2) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 25 μm 크기, 100개 투여)
- 3) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 30 μm 크기, 100개 투여)

- 4) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기, 100개 투여)
- 5) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 50 μm 크기, 100개 투여)
- 6) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 60 μm 크기, 100개 투여)

실험 진행 후, MTT 용액을 처리하고 배지를 씻어낸 뒤 DMSO를 이용해 세포를 녹여 흡광도를 측정하고 세포 생존율을 그래프화 하였다.

아래 그림 9는 약물장전구조체의 크기가 증가 할 때, 세포 성장 억제 능력에 대한 실험 결과이다. 그림에서 표현된 것과 같이, 72 시간 뒤의 대조군 세포 수를 100 %로 설정하여 비교하면, 약물장전구조체의 가로, 세로 길이 25, 30, 40, 50, 60 μm 에 대한 세포 생존율은 각각 42.5, 41.5, 31.6, 26.2, 23.4 %로 측정되었다.

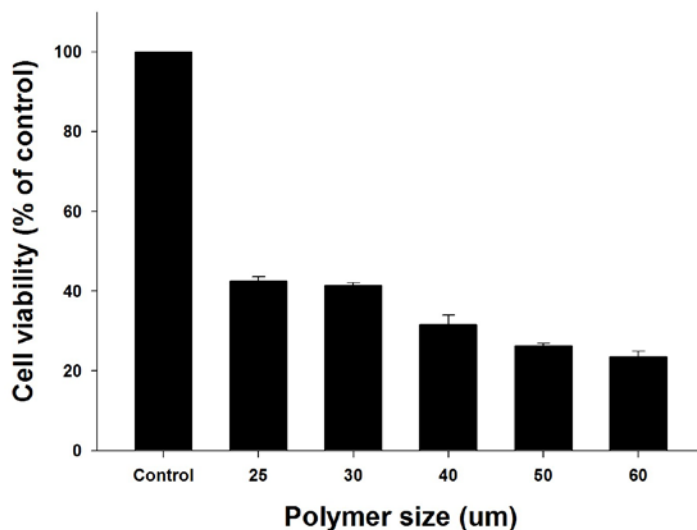


그림 9. 약물장전구조체의 크기별 실험 결과^⑦ [42]

^⑦ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 중앙내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 실험 결과를 그래프화 하였다.

이 실험을 통해, 동일한 조건에서 약물장전구조체의 크기가 커질수록 약물이 더 많이 장전되고, 그로 인해 동일한 시간동안 더 많은 약물이 분비됨을 확인 할 수 있었다.

두 번째 실험에서는, 약물장전구조체의 가로, 세로 길이는 40 μm 로 고정하고, 약물장전구조체의 개수가 10 배수로 증가 할 때, 세포 성장 억제 능력을 확인하였다. 총 1 개의 96 well plate에 각각 3×10^3 개의 NCI-N87 세포를 나누고 24 시간 동안 배양하였다. 이 후, 아래와 같이 투여한 약물장전구조체의 높이는 25 μm , 가로 및 세로 길이는 40 μm 로 일정할 때, 약물장전구조체의 개수를 각각 1, 10, 100개로 설정하고, 72 시간 동안의 MTT assay 실험을 통해 세포 성장 억제 효능을 확인하였다. 각각의 실험군에 대해서 6 회의 반복 실험을 진행하여 평균값이 신뢰 구간 95 % 안에 존재하도록 하였다.

※ 실험 조건

- 1) 대조군
- 2) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기, 1개 투여)
- 3) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기, 10개 투여)
- 4) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기, 100개 투여)

위와 같이 실험을 진행 한 후, MTT 용액을 처리하고 배지를 씻어낸 뒤 DMSO를 이용해 세포를 녹이고 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도에서 실험군을 대조군과 비교하여 SigmaPlot 프로그램을 통해

세포 생존율을 그래프화 하였다.

아래 그림 10은 동일한 조건에서 약물장전구조체의 개수가 증가 할 때, 세포 성장 억제 능력에 대한 실험 결과이다. 그림에서 표현된 것과 같이, 72 시간 후 대조군의 세포 수를 100 %로 설정했을 때, 구조체 개수가 1, 10, 100개 일 때 세포 생존율은 각각 99.8, 85.2, 30.9 %로 측정되었다. 이는, 약물장전구조체의 개수가 10배씩 증가할 수록 약물이 더 많이 분비 되는 것을 의미한다. 또한, 약물장전구조체 100개의 세포 생존율은 30.9 %로 측정되었는데 이는 앞서 진행한 약물장전구조체 크기에 따른 세포 생존율 평가 실험에서 동일한 조건의 결과값인 31.6 %와 매우 유사한 값이다. 이를 통해 실험 결과의 반복 실험에 대한 신뢰도가 높음을 알 수 있다.

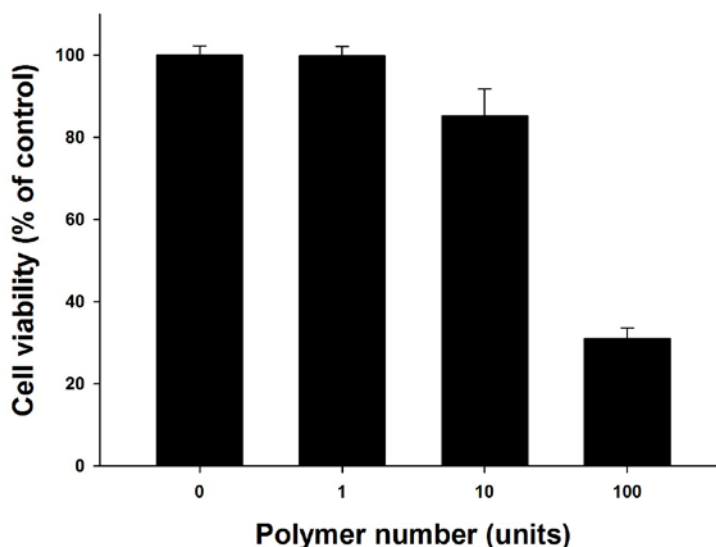


그림 10. 약물장전구조체 개수별 실험 결과^⑧ [42]

^⑧ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 중앙내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 실험 결과를 그래프화 하였다.

결론적으로, 앞선 두 실험을 통해 다른 조건들이 동일 할 때, 약물장전구조체의 크기가 증가 할 수록, 또는 약물장전구조체의 개수가 증가 할 수록 장전된 약물의 분비량이 증가하고 그로 인한 세포 성장 억제 능력이 향상됨을 알 수 있었다.

제 5 절 장시간 약물 분비 효능 검증

제 3절과 4절에서는 제작된 약물장전구조체의 약물 분비 특성에 대한 평가를 진행하였다. 이번 절에서는 제작된 약물장전구조체를 이용하여 장시간 동안 약물을 분비하는 약물전달시스템으로의 응용 가능성에 대한 검증을 위해 144 시간에 걸친 MTT assay 실험을 진행하였다. 총 6 개의 96 well plate에 단위 well 당 각각 3×10^3 개의 NCI-N87 세포를 나누고 24 시간 동안 배양하였다. 이 후, 각각의 well에 높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 길이를 가지는 약물장전구조체를 처리하였다. 동일한 실험 조건에서 Lapatinib의 세포 증식 억제 활성도와 비교하기 위해 각각 다음의 조건과 같이 실험을 진행하였으며, 각각의 실험군에 대해서 6 회의 반복 실험을 진행하여 평균값이 신뢰 구간 95 % 안에 존재하도록 하였다.

※ 실험 조건

- 1) 대조군
- 2) 실험군 (Lapatinib 0.01 uM 투여)
- 3) 실험군 (Lapatinib 0.1 uM 투여)
- 4) 실험군 (Lapatinib 1 uM 투여)
- 5) 실험군 (Lapatinib 10 uM 투여)
- 6) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기, 10개 투여)
- 7) 실험군 (높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기, 100개 투여)

위와 같이 실험을 진행 한 후, 24 시간 마다 한 개의 96 well plate에 대해 MTT 용액을 처리하고 배지를 씻어낸 뒤 DMSO로 세포를 녹이고 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도에서 실험군을 실험 시작 시의 대조군과 비교하여 SigmaPlot 프로그램을 통해 세포 생존율을 그래프화 하였다.

아래 그림 11은 제작된 약물장전구조체의 개수 및 약물 처리 시간이 증가 할 때, 세포 성장 억제 능력에 대한 실험 결과이다. 그림에서 표현된 것과 같이, 144 시간 후의 대조군은 실험 시작 시의 세포 수와 비교해서 2.5 배에 가까운 개체수로 증가하였음을 확인 할 수 있다. NCI-N87 세포의 배가 시간 (Doubling time)이 약 3-4일 인 것을 감안하면 정상적으로 세포의 개체수가 증가함을 알 수 있다. 이에 반해 실험군에서는, 동일한 약물 처리 시간에 대해 Lapatinib의 농도가 증가 할 수록 세포 성장 억제 능력이 증가 하는 경향을 보임을 확인 할 수 있다. 또한 약물 처리 시간이 증가 할 수록 대조군과의 차이가 벌어지는 것을 알 수 있다. 이는 동일한 Lapatinib 농도에 대해, 약물 처리 시간이 길어질 수록 세포 성장 억제 능력이 증가함을 의미한다. 앞서 제 3절에서 측정한 Lapatinib의 IC_{50} 값인 0.1 μM 은 이 실험 결과에서, 실험 시작 시의 세포 수에서 크게 증가하지 않고 비슷한 수준으로 유지 되는 것을 확인 할 수 있다. 또한, Lapatinib의 농도가 1 μM 이상인 경우에는 실험 시작 시의 개체 수 보다 더 줄어들었음을 확인 할 수 있으며, 이는 Lapatinib의 농도가 유효 농도보다 높게 투여되어 대다수의 NCI-N87 세포들에 작용한 결과로 판단된다.

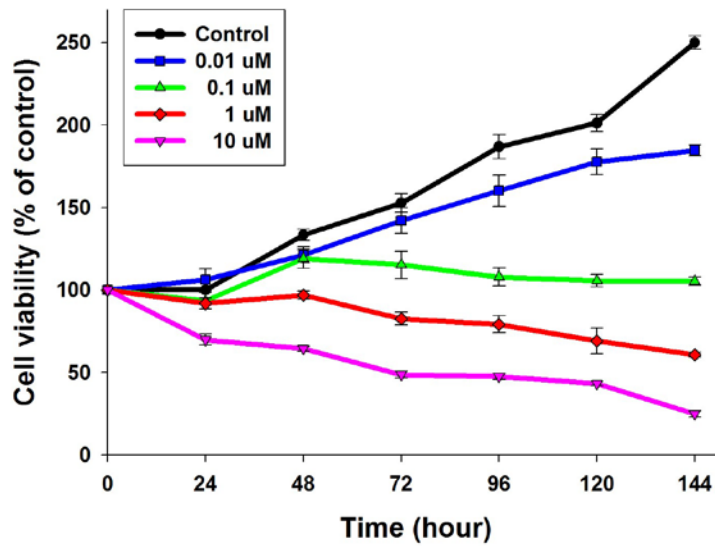


그림 11. Lapatinib의 농도 및 일차별 실험 결과^⑨ [42]

아래 그림 12는 제작된 약물장전구조체의 개수 및 약물 처리 시간이 증가 할 때, 세포 성장 억제 능력에 대한 실험 결과이다. 그림에서 표현된 것과 같이, 동일한 처리 시간에 대해 약물장전구조체의 개수가 증가 할 수록 세포 성장 억제 능력이 증가 하는 경향을 보임을 확인 할 수 있다. 또한 동일한 약물장전구조체 개수에 대해, 144 시간 동안 지속적으로 효과를 보이는 것을 확인 할 수 있다. 특히 제작된 약물장전구조체가 100개 투입된 실험군의 경우, 실험 시작 시의 세포 개체 수와 비교 할 때, 약물 투여 24, 48, 72, 96, 120, 144 시간에 대해 각각 100.6, 104.2, 101.9, 100.2, 80.8 %의 세포 개체 수를 보여주었다. 이 결과는, 주어진 조건에서 제작된 약물장전구조체가 앞

^⑨ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 중앙내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 실험 결과를 그래프화 하였다.

장에서 언급한 기존의 방법들과 같이 순간적으로 모든 약물이 분비되지 않고, 장전된 약물을 서서히 분비하여 장시간 동안의 세포 성장 억제 효과를 보여주는 것을 의미한다. 또한, 항암제로 사용된 Lapatinib이 단순히 모든 세포를 죽이는 것이 아니라, 세포의 증식을 억제하여 개체 수 증가를 방해하는 역할을 하는 것에 대해, 제작된 약물장전구조체에 장전된 Lapatinib 역시 같은 효능을 보일 수 있음을 암시한다.

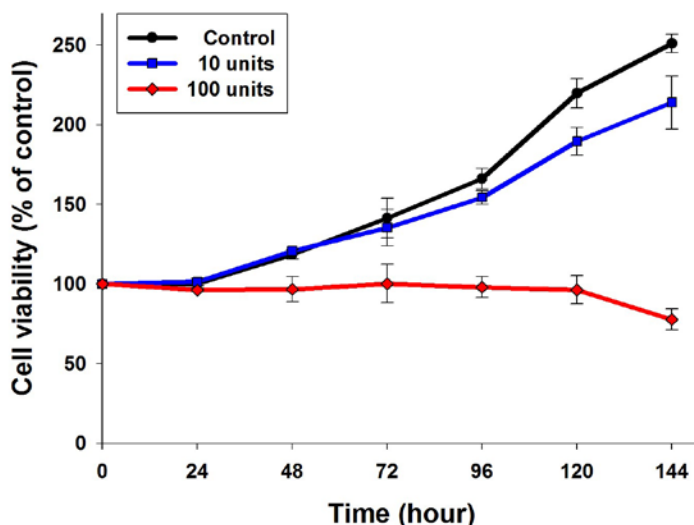


그림 12. 약물장전구조체의 개수 및 일차별 실험 결과^⑩ [42]

MTT assay 실험의 특성상, Colony forming assay 실험 방법처럼 세포 배양 및 실험에 사용되는 RPMI-1640 용액을 새 용액으로 교체할 수 없기 때문에, 144 시간 이상의 시간에 대해서는 실험을 진행할 수 없었지만, 약물 투여 120 시간 및 144 시간 후 측정된 결과값의

^⑩ 본 과제 참여연구원인 서울대학교 중앙내과 김태유 교수 연구진의 박사과정 정은구가 실험 결과를 그래프화 하였다.

경향성으로부터 제작된 약물장전구조체가 그 이 후 시간에서도 약물을 지속적으로 분비하여 세포 성장 억제를 효율적으로 할 수 있을 것이라는 예측이 가능하다.

상기 실험들을 통해, 제작된 약물장전구조체에 제 2장 1절에서 언급한 선택적인 박테리아 흡착 기술 [21]을 이용한다면 박테리아에 의해 종양 부위로 약물을 전달하고, 지속적으로 약물을 분비해주는 약물전달시스템에 응용 가능성을 확인 할 수 있다.

제 4 장 결 론

제 1 절 결론

본 논문에서는 박테리아 기반의 약물전달시스템을 소개하고 그 것에 적용하기 위해 생분해성 고분자 물질인 PCL과 분자표적 치료 항암제인 Lapatinib을 이용한 약물장전구조체를 제작하였다. 또한, 제작된 약물장전구조체의 *in vitro* 환경에서의 세포 성장 억제 효과를 확인하였다.

제작된 약물장전구조체는 SEM 및 형광 현미경을 통해 설계한 모양으로 제작된 것을 확인하였다. 제작 과정에서의 외부 요인에 의한 Lapatinib 변성에 대해 *in vitro* 환경에서의 실험을 진행하였으며, 비록 Lapatinib의 활성도가 감소하였지만 여전히 HER2/ErbB2 분자에 민감하게 반응하여 NCI-N87 세포의 성장을 억제하는 사실을 확인하였다.

이 후, *in vitro* 환경에서 약물장전구조체의 크기 및 개수가 증가 할 수록 약물 분비가 더 많이 되어 세포 성장을 효율적으로 억제함을 확인하였으며, 144 시간에 걸쳐 진행된 실험을 통해 높이 25 μm , 가로 및 세로 40 μm 크기를 가지는 약물장전구조체 100개가 투여된 경우 144 시간 동안 성공적으로 세포 성장을 억제함을 확인하였다.

결론적으로, 제작된 약물장전구조체가 효과적으로 세포 성장을 억제할 수 있으며, 약물전달시스템 구현에 사용 가능할 것으로 판단된다.

제 2 절 향후 연구 계획

본 논문에서는 박테리아 기반의 약물전달시스템으로의 응용을 위해 약물장전구조체를 제작하고 *in vitro* 환경에서의 세포 성장 억제 효능을 검증하였다. 향후 연구는 다음과 같이 3가지의 큰 목적을 가지고 진행될 것이다.

첫 번째로, 선택적인 박테리아 흡착을 통해 박테리아 기반의 약물전달시스템 완성을 진행하고자 한다. 고체의 Lapatinib이 장전된 약물장전구조체를 미세 유체 플랫폼에서 날개로 고정시키고 [21], 박테리아를 흘려주어 물리적인 흡착을 유도하여 박테리아와 약물장전구조체의 물리적인 흡착을 통해 약물전달시스템을 완성하는 것이다.

두 번째로는, 완성된 박테리아 기반의 약물전달시스템을 이용한 *in vivo* 환경에서의 동물 실험을 통해 동물의 체내에서 약물장전구조체가 박테리아에 의해 효율적으로 종양 부위로 다가가는 것을 확인해야 한다. 이것은 이미 소개된 기법 [11]을 통해 확인 가능하다. 이를 통해 박테리아 기반의 약물전달시스템이 종양 세포를 능동적으로 찾아가는 개념을 실현하게 될 것이다.

세 번째로는, 제작된 약물장전구조체의 *in vivo* 환경에서의 동물 실험을 통해 장시간 동안 종양 세포 증식을 억제하는 효과를 보이는 것을 확인하는 것이다.

위 연구들을 통해 능동적으로 종양 세포로 다가가서 장시간 동안

약물을 분비해 효과적으로 종양 세포 증식을 억제하는 박테리아 기반의
약물전달시스템의 최종 목표를 구현 할 수 있을 것으로 생각한다.

참고 문헌

- [1] R. Langer, "Drug delivery and targeting," *Nature*, vol. 392, pp. 5–10, 1998.
- [2] T. M. Allen and P. R. Cullis, "Drug Delivery Systems: Entering the Mainstream," *Science*, vol. 303, pp. 1818–1822, 2004.
- [3] F. S. Patel, R. V. Kulkarni, and H. M. Nanjappaiah, "Multi-Particulate Drug Delivery System for the Treatment of Diabetes Mellitus: In Vitro and In Vivo Evaluation," *Particulate Science and Technology*, vol. 32, pp. 477–485, 2014.
- [4] S. Lee, S. J. Hong, H. J. Yoo, J. H. Ahn, and D.-I. Cho, "Integrated Microfluidic System Capable of Size-Specific Droplet Generation with Size-Dependent Droplet Separation," *Journal of Biomedical Nanotechnology*, vol. 9, pp. 944–948, 2013.
- [5] M. R. Prausnitz, J. Jiang, S. R. Patel, H. S. Gill, D. Ghate, B. E. McCarey, *et al.*, "Ocular Drug Delivery Using Microneedles," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 48, p. 3191, 2007.

- [6] B. P. Timko, M. Arruebo, S. A. Shankarappa, J. B. McAlvin, O. S. Okonkwo, B. Mizrahi, *et al.*, "Near-infrared-actuated devices for remotely controlled drug delivery," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 111, pp. 1349–1354, 2014.
- [7] M. Hrubý, Č. Koňák, and K. Ulbrich, "Polymeric micellar pH-sensitive drug delivery system for doxorubicin," *Journal of Controlled Release*, vol. 103, pp. 137–148, 2005.
- [8] D. Needham and M. W. Dewhirst, "The development and testing of a new temperature-sensitive drug delivery system for the treatment of solid tumors," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 53, pp. 285–305, 2001.
- [9] Y. Qiu and K. Park, "Environment-sensitive hydrogels for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 53, pp. 321–339, 2001.
- [10] R. W. Kasinskas and N. S. Forbes, "*Salmonella typhimurium* specifically chemotax and proliferate in heterogeneous tumor tissue *in vitro*," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 94, pp. 710–721, 2006.
- [11] J.-J. Min, V. H. Nguyen, H.-J. Kim, Y. Hong, and H. E. Choy, "Quantitative bioluminescence imaging of tumor-targeting bacteria in living animals," *Nature Protocols*, vol. 3, pp. 629–

636, 2008.

- [12] B. Behkam and M. Sitti, "Effect of quantity and configuration of attached bacteria on bacterial propulsion of microbeads," *Applied Physics Letters*, vol. 93, p. 223901, 2008.
- [13] S. J. Park, H. Bae, J. Kim, B. Lim, J. Park, and S. Park, "Motility enhancement of bacteria actuated microstructures using selective bacteria adhesion," *Lab on a Chip*, vol. 10, pp. 1706–1711, 2010.
- [14] S. J. Park, S.–H. Park, S. Cho, D.–M. Kim, Y. Lee, S. Y. Ko, *et al.*, "New paradigm for tumor theranostic methodology using bacteria–based microrobot," *Scientific Reports*, vol. 3, p. 3394, 2013.
- [15] D. I. Cho, H. J. Yoo, S. Lee, S. J. Hong, J. M. Seo, T. Y. Kim, *et al.*, "TRENDS IN DRUG–DELIVERY–SYSTEM MICROFABRICATION AND A NEW SCALABLE TECHNOLOGY USING X–RAY SYNCHROTRON IRRADIATION," in *Solid–State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII), 2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on*, Barcelona, Spain, 2013, pp. 1603–1608.
- [16] D. W. Rusnak, K. Affleck, S. G. Cockerill, C. Stubberfield, R.

- Harris, M. Page, *et al.*, "The Characterization of Novel, Dual ErbB-2/EGFR, Tyrosine Kinase Inhibitors: Potential Therapy for Cancer," *Cancer Research*, vol. 61, pp. 7196–7203, 2001.
- [17] D. W. Rusnak, K. Lackey, K. Affleck, E. R. Wood, K. J. Alligood, N. Rhodes, *et al.*, "The Effects of the Novel, reversible Epidermal Growth Factor Receptor/ErbB-2 Tyrosine Kinase Inhibitor, GW2016, on the Growth of Human Normal and Tumor-derived Cell Lines *in vitro* and *in vivo*," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 1, pp. 85–94, 2001.
- [18] G. E. Konecny, M. D. Pegram, N. Venkatesan, R. Finn, G. Yang, M. Rahmeh, *et al.*, "Activity of the Dual Kinase Inhibitor Lapatinib (GW572016) against HER-2-Overexpressing and Trastuzumab-Treated Breast Cancer Cells," *Cancer Research*, vol. 66, pp. 1630–1639, 2006.
- [19] Y. Zhou, S. Li, Y. P. Hu, J. Wang, J. Hauser, A. N. Conway, *et al.*, "Blockade of EGFR and ErbB2 by the Novel Dual EGFR and ErbB2 Tyrosine Kinase Inhibitor GW572016 Sensitizes Human Colon Carcinoma GEO Cells to Apoptosis," *Cancer Research*, vol. 66, pp. 404–411, 2006.
- [20] Q. Ryan, A. Ibrahim, M. H. Cohen, J. Johnson, C.-w. Ko, R. Sridhara, *et al.*, "FDA Drug Approval Summary: Lapatinib in

Combination with Capecitabine for Previously Treated Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER-2," *The Oncologist*, vol. 13, pp. 1114–1119, 2008.

- [21] K. Huh, D. Oh, H. J. Yoo, J.-M. Seo, D.-I. Cho, and S.-J. Kim, "Anisotropic Bacterial Adsorbed Micro Chambers by Microfluidic Trapping Array," in *Control, Automation and Systems (ICCAS), 2013 13th International Conference on*, Gwangju, Korea, 2013, pp. 1513–1517.
- [22] I. Vroman and L. Tighzert, "Biodegradable polymers," *Materials*, vol. 2, pp. 307–344, 2009.
- [23] M. Vert, K.-H. Hellwich, M. Hess, P. Hodge, P. Kubisa, M. Rinaudo, *et al.*, "Terminology for biorelated polymers and applications (IUPAC Recommendations 2012)," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 84, pp. 377–410, 2012.
- [24] M. N. V. R. Kumar, "Nano and Microparticles as Controlled Drug Delivery Devices," *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, pp. 234–258, 2000.
- [25] R. R. Love, H. Leventhal, D. V. Easterling, and D. R. Nerenz, "Side Effects and Emotional Distress During Cancer Chemotherapy," *Cancer*, vol. 63, pp. 604–612, 1989.
- [26] A. H. Partridge, H. J. Burstein, and E. P. Winer, "Side Effects of Chemotherapy and Combined Chemohormonal Therapy in

- Women With Early-Stage Breast Cancer," *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, vol. 2001, pp. 135–142, 2001.
- [27] D. A. Haber, D. W. Bell, R. Sordella, E. L. Kwak, N. Godin-Heymann, S. V. Sharma, *et al.*, "Molecular Targeted Therapy of Lung Cancer: EGFR Mutations and Response to EGFR Inhibitors," in *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, New York, U. S. A., 2005, pp. 419–426.
- [28] J. M. Llovet and J. Bruix, "Molecular Targeted Therapies in Hepatocellular Carcinoma," *Hepatology*, vol. 48, pp. 1312–1327, 2008.
- [29] A. Bianco, K. Kostarelos, and M. Prato, "Applications of carbon nanotubes in drug delivery," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 9, pp. 674–679, 2005.
- [30] Z. Liu, K. Chen, C. Davis, S. Sherlock, Q. Cao, X. Chen, *et al.*, "Drug Delivery with Carbon Nanotubes for *in vivo* Cancer Treatment," *Cancer Research*, vol. 68, pp. 6652–6660, 2008.
- [31] A. A. Bhirde, V. Patel, J. Gavard, G. Zhang, A. A. Sousa, A. Masedunskas, *et al.*, "Targeted Killing of Cancer Cells *in vivo* and *in vitro* with EGF-Directed Carbon Nanotube-Based Drug Delivery," *American Chemical Society (ACS) Nano*, vol. 3, pp. 307–316, 2009.

- [32] K. Kataoka, A. Harada, and Y. Nagasaki, "Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 47, pp. 113–131, 2001.
- [33] H. J. Yoo, S. J. Hong, S. M. Lee, J. H. Ahn, and D. I. Cho, "Fabrication of Laminated Biodegradable Polymeric Structure for Controlled Drug Release," presented at the The 14th Korean MEMS Conference (KMEMS), Jeju-do, Korea, 2012.
- [34] Y. Lu and S. C. Chen, "Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 56, pp. 1621–1633, 2004.
- [35] S. C. Chen and Y. Lu, *Micro-and nano-fabrication of biodegradable polymers* vol. 1, 2005.
- [36] O. Schmalz, M. Hess, and R. Kosfeld, "Structural changes in poly (methyl methacrylate) during deep-etch X-ray synchrotron radiation lithography. Part II: Radiation effects on PMMA," *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, vol. 239, pp. 79–91, 1996.
- [37] O. Schmalz, M. Hess, and R. Kosfeld, "Structural changes in poly (methyl methacrylate) during deep-etch X-ray synchrotron radiation lithography. Part III: Mode of action of the developer," *Die Angewandte Makromolekulare Chemie*,

- vol. 239, pp. 93–106, 1996.
- [38] D. Cam, S.-h. Hyon, and Y. Ikada, "Degradation of high molecular weight poly (L-lactide) in alkaline medium," *Biomaterials*, vol. 16, pp. 833–843, 1995.
- [39] B. Song, H. J. Yoo, E.-G. Jeong, S. J. Kim, J. M. Seo, T.-Y. Kim, *et al.*, "Fabrication of Biodegradable Polymeric Micro Chambers Encapsulated with Pulverized Drug for Bacteria-Based Microrobots," in *Control, Automation and Systems (ICCAS), 2014 14th International Conference on*, Gyeonggi-do, Korea, 2014, pp. 348–351
- [40] M. V. Berridge and A. S. Tan, "Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 303, pp. 474–482, 1993.
- [41] L. Varshney and P. B. Dodke, "Radiation effect studies on anticancer drugs, cyclophosphamide and doxorubicin for radiation sterilization," *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 71, pp. 1103–1111, 2004.
- [42] E.-G. Jung, H. J. Yoo, B. Song, H.-P. Kim, S.-W. Han, T.-Y. Kim, *et al.*, "Evaluation of Lapatinib Powder-Entraped

Biodegradable Polymeric Microstructures Fabricated by X-Ray Lithography for a Targeted and Sustained Drug Delivery System," *Materials*, Submitted.

Abstract

Fabrication and *in vitro* Evaluation of a Biodegradable–Polymer–Based Drug Delivery System

Byeonghwa Song

Electrical Engineering and Computer Science

The Graduate School

Seoul National University

In standard chemotherapy, only a limited dose of anticancer drug is allowed to be administered or injected to the human body, due to cytotoxicity of the anticancer drug. Absorption, excretion and disappearance of the anticancer drug administered in the course of movement to the tumor lead to a very low efficiency. In addition, there is a need for a periodic medication as a liquefied anticancer drug is used, which is absorbed very quickly. To address the problems in delivering the anticancer drug to the tumor site, various

drug delivery systems (DDSs) are being studied worldwide, and bacteria-based DDSs using chemotactic bacteria have been proposed. Even though, DDSs may not escape from the confines of the periodic medication as majority of DDSs are developed using the liquefied anticancer drug.

In this paper, Lapatinib-entrapped micro chambers, which are essential components for the realization of a bacteria-based sustained DDS, are fabricated, and *in vitro* evaluation on NCI-N87 cells are performed. A biodegradable, biocompatible synthetic polymer, polycaprolactone (PCL), is used as a carrier material, and a molecular targeted anticancer drug, Lapatinib, is used as a drug for the proposed DDS.

Lamination process and x-ray lithography process are performed to fabricate Lapatinib-entrapped micro chambers. Then, *in vitro* experiments on NCI-N87 cells are conducted by varying the size and the number of the Lapatinib-loaded micro chambers. Also, drug release characteristic of the fabricated micro chambers is evaluated by an MTT assay for 144 hours.

During the fabrication process, the half-maximal inhibitory concentration (IC_{50}) value of Lapatinib to NCI-N87 cells is increased. Nevertheless, Lapatinib is still effectively inhibiting tumor proliferation. In addition, as the size and the number of the

Lapatinib–entrapped micro chambers are increased, the amount of the released drug is increased. Finally, Lapatinib–entrapped micro chambers have successfully suppressed the tumor growth for 144 hours

In summary, Lapatinib–entrapped micro chambers are fabricated and their drug release characteristics are evaluated. We anticipate that the fabricated Lapatinib–entrapped micro chambers could be applied for a bacteria–based sustained DDS and might help addressing some difficult issues in the standard chemotherapy.

Keywords: Drug delivery system (DDS), Biodegradable polymer, Polycaprolactone (PCL), X–ray lithography, Lapatinib

Student Number : 2013–20805